

10/533 618

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP2003/012011

International filing date: 29 October 2003 (29.10.2003)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: PCT/EP02/13088
Filing date: 21 November 2002 (21.11.2002)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2006 (27.01.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in
compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BEST AVAILABLE COPY

Europäisches
Patentamt

European Patent
Office

PCT/EP2003/012011
Office européen
des brevets



Bescheinigung

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

Certificate

The attached documents are exact copies of the International patent application described on the following page, as originally filed.

Attestation

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

27. 11. 2003

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.
J. Auller

Patentanmeldung Nr.
Patent application no.
Demande de brevet n°

PCT/EP 02/13088

**Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**



Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: PCT/EP 02/13088

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
1. VIRAMED BIOTECH AG - Planegg, Deutschland
2. KINTRUP, Martin - Gauting, Deutschland (nur US)
3. THÜRING-NAHLER, Heike - Oberasbach, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Mittel und Verfahren zur Diagnose einer Treponemainfektion

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 21. November 2002 (21.11.2002)

In Anspruch genommene Priorität(en)
Priority(ies) claimed
Priorité(s) revendiquée(s)
Staat: Deutschland Tag: 29. Oktober 2002 Aktenzeichen: 102 50 368.0
State: Date: (29.10.2002) File no.
Pays: Date: Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Weitere Anmelder:

4. KRONSTEINER, Lilly - Planegg, Deutschland (nur US)
5. HELBL, Vera - München, Deutschland (nur US)
6. ENGEL, Heinz - München, Deutschland (nur US)
7. FURTMAYR, Ludwig - Steingaden, Deutschland (nur US)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN Bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden.

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen:

Regionales Patent

AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZM Sambia, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*)

EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist

EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, BG Bulgarien, CH & LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, CZ Tschechische Republik, DE Deutschland, DK Dänemark, EE Estland, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden, SK Slowakei, TR Türkei und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist

OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GQ Äquatorialguinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*)

Nationales Patent (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*):

<input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate	<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland
<input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda	<input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatiens	<input checked="" type="checkbox"/> OM Oman
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien	<input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn	<input checked="" type="checkbox"/> PH Philippinen
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien	<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien	<input checked="" type="checkbox"/> PL Polen
<input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich	<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australien	<input checked="" type="checkbox"/> IN Indien	<input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan	<input checked="" type="checkbox"/> IS Island	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina	<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien	<input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan	<input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien	<input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien
<input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize	<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei
<input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada	<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Schweiz und Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input checked="" type="checkbox"/> CO Kolumbien	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho	<input checked="" type="checkbox"/> TN Tunesien
<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen	<input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei
<input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik	<input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland	<input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania
<input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland	<input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica		<input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika
<input checked="" type="checkbox"/> DZ Algerien	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar	
<input checked="" type="checkbox"/> EC Ecuador	<input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estland	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei	<input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi	<input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko	<input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika
<input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich	<input checked="" type="checkbox"/> MZ Mosambik	<input checked="" type="checkbox"/> ZM Sambia
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien		
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana		

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind.

VC St. Vincent und Grenadinen

.....

SC Seychellen

.....

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (*Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.*)

Mittel und Verfahren zur Diagnose einer Treponemainfektion

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Träger für die Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion sowie ein Diagnostikverfahren unter Einsatz des genannten Trägers. Treponemainfektionen können damit detektiert, bestätigt und im Krankheitsverlauf kontrolliert werden.

Die Klinik der Syphilis kann grundsätzlich in unterschiedlichen Stadien verlaufen, die als Primärsyphilis, Sekundärsyphilis und Tertiärsyphilis bezeichnet werden.

Ein direkter Erregernachweis ist lediglich im Primärstadium eine gute Diagnosemöglichkeit. Der Nachweis erfolgt hierbei direkt aus der Gewebeprobe und kann durch Dunkelfeldmikroskopie, direkte Immunfluoreszenz oder eine *Treponema pallidum* spezifische PCR durchgeführt werden.

Serologische Verfahren zum Antikörernachweis sind in allen Krankheitsstadien gut möglich. Sie geben Aufschluß über charakteristische Antikörperkonstellationen, die Informationen über die Behandlungsbedürftigkeit geben.

Im wesentlichen spielen dabei anti-*Treponema pallidum*-spezifische Antikörper und Antikörper gegen Cardiolipin eine Rolle.

Anti-Cardiolipin-Antikörper vom IgG- oder IgM-Typ können bei Patienten mit *Treponema* Infektionen vorkommen und können mit dem CMT - Test (Cardiolipin - Mikroflockungs - Test, englisch VDRL Test: Veneral Disease Research Laboratories Test) oder dem RPR - Test (Rapid Plasma Reagins - Test) oder dem Cardiolipin Komplement-bindungsreaktions - Test nachgewiesen werden. Bei diesen Analyseverfahren werden positive Signale beim Vorhandensein von anti-lipoidalen Antikörpern in der Probe beobachtet. Der VDRL Test kann bei entsprechenden Probenverdünnungen quantitativ durchgeführt werden, so dass ein Titer, bei dem eine deutliche Flockung gerade noch auftritt, als positiv gewertet wird. Der Test eignet sich gut zur Verlaufskontrolle und Therapiekontrolle, kann aber auch unspezifisch reagieren. Kreuzreaktionen treten unter anderem bei Au-

toimmunerkrankungen auf, wie zum Beispiel beim Anti-Phospholipid-Syndrom oder beim Systemischen Lupus Erythematoses.

Anti-Treponema-pallidum-spezifische Antikörper können gegen Proteine aus Treponema pallidum gebildet werden. Der Nachweis dieser Antikörper kann als Suchtest, als TPHA (Treponema Pallidum Hämagglutinations Test), TPPA (Treponema Pallidum Partikel Agglutinations Test) oder TPLA (Treponema Pallidum Latex Agglutinations Test) durchgeführt werden.

Die diagnostisch relevanten Proteine aus Treponema pallidum umfassen unter anderem die Proteine mit Molekulargewichten von 47 kD, 44,5 kD, 37 kD, 17kD und 15 kD (Labor und Diagnose, Herausgeber: Lothar Thomas, Seiten 1234 ff., TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2000; DE19536166; WO8802403; Sambri et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001 May;8(3):534-9). In unterschiedlichen marktgängigen Testen (Innolab Syphilis, Innogenetics, Belgien; Treponema Marblot, MarDx, USA; Treponema Rebia Syphilis, Mikrogen, Deutschland) werden Kombinationen aus diesen Proteinen auf festphasigen Trägermaterialien immobilisiert. Während der Inkubation der Probe mit dem beschichteten Trägermaterial können Treponema pallidum spezifische Antikörper an die Antigene binden und nachfolgend durch eine immunochemische Reaktion nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Treponema pallidum spezifischen Antikörper kann im Format eines ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) zum Beispiel als Suchtest für Syphilis eingesetzt werden oder im Format von Immunoblots als Bestätigungstest für Syphilis.

Immunoblots werden daher bei unklaren Befunden aus den Suchreaktionen, als Bestätigungsstests und zur Verlaufskontrolle eingesetzt.

Zur Bewertung der Behandlungsbedürftigkeit sind vor allem Testverfahren zur Bestimmung von anti-Treponema-pallidum-spezifischen IgM-Antikörpern von Bedeutung. Typischerweise ist dieser Nachweis mit einem Tp-IgM-FTA Test (Fluoreszenz Treponema Antikörper–Absorptions–Test) oder einem Tp-IgM-Elisa oder einem Treponema pallidum IgM Immunoblot möglich.

Zur serologischen Verlaufskontrolle und Therapiekontrolle sind vornehmlich Verfahren indiziert, die eine zumindest semiquantitative Bestimmung von anti Cardiolipin Antikörpern beinhalten.

Die aus dem Stand der Technik bekannten zur serologischen Bestätigung geeigneten Nachweisverfahren erlauben keine quantitative Bestimmung der Antikörper in der Patientenprobe. Ferner haben sie den Nachteil, dass sie es praktisch nicht ermöglichen, zu bestimmen, ob eine Treponemainfektion noch akut oder bereits abgeklungen ist. Dies beruht unter anderem darauf, dass Antikörper gegen Treponemaantigen noch sehr lange nachweisbar sind, selbst wenn die eigentliche Infektion – das heißt das Vorliegen von Erregern – bereits abgeklungen ist. Ferner sind die Tests aus dem Stand der Technik teilweise umständlich von der Verfahrensführung und somit für den Routinebereich und Hochdurchsatztechnologien ungeeignet.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, Mittel und Verfahren anzugeben, die einerseits möglichst einfach zu handhaben sind und ferner eine serologische Verlaufskontrolle des tatsächlichen Infektionsgrads ermöglichen.

Das vorliegende Problem wird gelöst durch einen Träger für die Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion, der mindestens ein immobilisiertes Cardiolipin und mindestens ein immobilisiertes Treponema-spezifisches Antigen enthält.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Cardiolipin zusammen mit Lecithin und Cholesterin eingesetzt. Diese Kombination aus Cardiolipin, Lecithin und Cholesterin wird im Folgenden auch als VDRL-Antigen bezeichnet.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das VDRL-Antigen die genannten Bestandteile in folgenden Massenverhältnissen Cardiolipin : Lecithin : Cholesterin in den Verhältnissen 0,1 bis 4,0: 1 bis 5,0: 1 bis 10,0. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Massenverhältnisse 1 bis 3,0 für Cardiolipin : 1 bis 3 für Lecithin : 5 bis 10 für Cholesterin.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der Träger mehrere Positionen mit Cardiolipin, mindestens zwei, vorzugsweise mindestens drei, besonders bevorzugt mindestens vier Positionen, an denen das Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen vorliegt. Diese Konzentrationen sind für die einzelnen Positionen vorzugsweise wie folgt: 0,10 bis 1,00 mg/ml (Position 1), 0,05 – 0,50 mg/ml (Position 2), 0,02 bis 0,2 mg/ml (Position 3), 0,01 bis 0,1 mg/ml (Position 4).

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der Träger mindestens zwei, vorzugsweise mindestens drei, besonders bevorzugt mindestens vier verschiedene Treponema-spezifische Antigene, wobei jedes Antigen in einer unterschiedlichen Position auf dem Träger immobilisiert ist.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Treponema-spezifischen Antigene ausgewählt aus Antigenen von *Treponema pallidum*, vorzugsweise handelt es sich hierbei um die 15 kD, 17 kD, 44,5 kD und 47 kD Antigene.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der Träger weitere Kontrollen, die geeignet sind, die sachgemäße Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens anzuzeigen. Zu diesen Kontrollen zählt bspw. eine Serumkontrolle. Diese Kontrolle zeigt an, dass der Teststreifen in der Tat beim Durchführen des Verfahrens mit Serum in Kontakt gebracht worden ist.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt die Kontrolle eine sog. Cut-Off-Kontrolle dar, welche bspw. eine Verdünnung von gereinigtem humanen Immunglobulin enthält. Diese Kontrolle dient der Auswertung, indem ein schwächeres Signal als die Cutoff-Kontrolle einem negativen Testergebnis entspricht, während ein stärkeres Signal einem positiven Testergebnis entspricht. Als Trägermaterialien kommen Nitrocellulose, PVDF (Polyvinylidendifluorid), Nylon, Celluloseacetat, Polystyrol in Betracht, wobei Nitrocellulose besonders bevorzugt ist. Es hat sich gezeigt, dass beim Einsatz von Nitrocellulose ein besonders gutes Signal- Hintergrundverhältnis, insbesondere für das VDRL-Signal erhalten wird.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Träger als Teststreifen ausgestaltet, insbesondere in einem Format, das den Einsatz in herkömmlichen Verfahren der Immundiagnostik erlaubt.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Träger als Westernblot ausgestaltet. Dabei enthält der Träger die diversen Reagenzien in immobilisierter Form.

Das oben genannte technische Problem wird ebenfalls gelöst durch ein Verfahren zur Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein oben genannter Träger mit einer Patientenprobe in Kontakt gebracht wird und so das Vorliegen von Antikörpern gegen ein Treponema-Antigen und/oder Cardiolipin in der Patientenprobe bestimmt wird.

Vorzugsweise handelt es sich bei der Patientenprobe um eine Blut-, Serum-, Plasma-, Liquor- oder Synovialflüssigkeitsprobe des zu untersuchenden Patienten. Der Verfahrensablauf entspricht den üblichen Verfahren auf dem Gebiet der Immundiagnostik und ist dem Fachmann geläufig.

Das oben genannte technische Problem wird ferner gelöst durch einen Testkit zur Diagnose einer Treponemainfektion und/oder der Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion, wobei der Testkit einen eingangs genannten Träger enthält sowie die weiteren Reagenzien zur Durchführung des diagnostischen Verfahrens sowie eine Gebrauchsanleitung zur Durchführung des Assays.

Mit dem neuen Testverfahren bzw. Träger können in einem Ansatz sowohl Treponema pallidum spezifische Antikörper jeweils gegen das 47 kD -, das 44,5 kD -, das 17 kD und das 15 kD Protein als auch Antikörper gegen das VDRL Antigen (Cardiolipin : Lecithin : Cholesterin), insbesondere Cardiolipin, nachgewiesen werden.

Durch die Kombination von *Treponema pallidum* spezifischen Antigenen (47 kD -, 44,5kD-, 17 kD-, 15 kD - Proteine) mit nicht-*Treponema pallidum* Antigenen (z.B. Cardiolipin) in einem Testformat kann gewährleistet werden, dass eine sicherere, besser automatisierbare und aussagekräftigere Syphilis-Diagnostik erfolgen kann.

Im Rahmen der Stufendiagnostik zur Diagnose der Syphilis ist es somit möglich, nach einem Screening Test (TPPA, TPHA, TPLA, Tp Elisa) anschließend mit dem erfindungsgemäßen Träger bzw. Verfahren sowohl die serologische Bestätigungsreaktion, als auch die Analyse zur Feststellung der Behandlungsbedürftigkeit, als auch die serologische Verlaufskontrolle durchführen zu können.

Insbesondere die Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion wird mittels des erfindungsgemäßen Trägers zuverlässig und einfach möglich. Das mit VDRL-Antigen erhaltenen Meßsignal ist eine zuverlässige Größe für den Grad der Treponemainfektion. Während die in der Patientenprobe vorliegende Reaktivität mit den *Treponema*-Antigenen relativ unabhängig ist von dem Grad der Infektion (d.h. der Schwere der Infektion) gibt das VDRL-Signal hierzu aussagekräftigere Werte. Dabei war es insbesondere überraschend, dass es gelungen ist, die körpereigenen Lipide (Cardiolipin, Lecithin und Cholesterin) derart auf einen festen Träger zu immobilisieren, dass deren Reaktivität mit den Antikörpern des Patientenmaterials erhalten bleibt. Dies war keineswegs zu erwarten, da es sich bei den Lipidstrukturen, insbesondere beim Cardiolipin, um relativ labile dreidimensionale Strukturen handelt, so dass das Aufbringen auf einen festen Träger ein hohes Risiko der Zerstörung der relevanten Epitope darstellte. Überraschenderweise blieben die diagnostisch relevanten Epitope jedoch auch nach Fixierung auf dem festen Träger erhalten und erlauben somit einen raschen, einfachen und dennoch sicheren Nachweis der gegen Cardiolipin gerichteten Antikörper.

Abbildung 1 zeigt einen erfindungsgemäßen Träger mit VDRL-Antigenen verschiedener Konzentration sowie vier verschiedenen *Treponema pallidum* Antigenen

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Herstellung des Treponema Testsstreifens

Herstellung des VDRL Antigens

VDRL Antigen wurde aus einer Mischung aus den Einzelkomponenten Cardiolipin, Lecithin und Cholesterin in Ethanol hergestellt. Cardiolipin wurde aus Rinderherz gereinigt (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA), Lecithin aus Hühnerei (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) und Cholesterin aus Wollfett (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA). Die Einzelkomponenten wurden in Reinheitsstufen von mindestens 98 % eingesetzt. Die Einzelkomponenten lagen jeweils als Trockensubstanz vor und wurden in Ethanol (100%) aufgenommen. Die Konzentration von Cardiolipin betrug 4 g/l in Ethanol (100%), die Konzentration von Lecithin betrug 100 g/l in Ethanol (100%) und die Konzentration von Cholesterin betrug 25g/l in Ethanol (100 %). In der Reihenfolge Cardiolipin, Lecithin und Cholesterin wurden die Einzelkomponenten entsprechend dem gewünschten Mischungsverhältnis gemischt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 12-24 Stunden im Dunkeln vor einer weiteren Verarbeitung aufbewahrt. In der VDRL Mischung lagen die Massenverhältnisse von Cardiolipin:Lecithin:Cholesterin im Bereich von (0,1-4,0) : (0,1-5,0) : (0,1-10,0). Gute Ergebnisse wurden mit einer Mischung aus Cardiolipin : Lecithin : Cholesterin mit einem Massenverhältniss von 2,0:1,4:9,0 erzielt.

Herstellung von VDRL - Verdünnungen

VDRL Antigen wurde in phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH7,2 stufenweise in 1,4- bis 1000 – fachen Verdünnungen hergestellt.

Herstellung von Treponema spezifischen Antigenlösungen

47 kD Protein aus Treponema pallidum (Capricorn,USA), 44,5 kD Protein aus Treponema pallidum (Lee Laboratories, USA), 17 kD Protein aus Treponema pallidum (Lee Laboratories, USA) und 15 kD Protein aus Treponema pallidum (Lee Laboratories, USA) wurden zur Herstellung der Treponema spezifischen Antigenlösungen verwendet. Die Verdünnungen der Antigene erfolgte in phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH7,2. Es wurden Konzentrationen zwischen 1 µg/ml und 200 µg/ml pro Antigen verwendet. Gut geeignet haben sich beim 47 kD Protein Lösungen mit einer Konzentration von 60 µg/ml, beim 44,5 kD Protein Lösungen mit einer Konzentration von 5 µg/ml, beim 17 kD Protein

Lösungen mit einer Konzentration von 10 µg/ml und beim 15 kD Protein Lösungen mit einer Konzentration von 20 µg/ml.

Immobilisierung der Antigene auf festphasigem Trägermaterial

Als festphasiges Trägermaterial wurde Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) eingesetzt. Die entsprechend verdünnten Antigene (Konzentrationen: VDRL: 1,40 – fache, 28,6 – fache, 55,6 – fache und 111,1 – fache Verdünnung der VDRL Antigenlösung; 47 kD – Protein: 60 µg/ml; 44,5 kD – Protein: 5µg/ml; 17 kD – Protein: 10 µg/ml; 15 kD – Protein: 20 µg/ml) konnten durch passive Adsorption auf Nitrocellulose als festphasigem Trägermaterial gebunden werden. Die Antigen-Lösungen wurden mit einem Dispensierautomaten mit Tropfengrößen von 10,67 nl bis 85 nl und Flussraten von 0,5 µl/cm bis 5,0 µl/cm aufgetragen.

Blockierung freier Bindestellen

Mit Antigen beschichtete Nitrocellulose wurde mit einem Puffer aus Trishydroxymethylaminomethan (3,25 g/l), Natriumchlorid (7,51 g/l), Tween 20 (3,83 ml/l), Thimerosal (0,02 g/l), Milchpulver (40 g/l), pH 7,5, bei 37 °C 30 min inkubiert, anschließend in einem Puffer aus Trishydroxymethylaminomethan (3,25 g/l), Natriumchlorid (7,51 g/l), Tween 20 (3,83 ml/l), Thimerosal (0,02 g/l), Milchpulver (5 g/l), pH 7,5, bei 37 °C 30 min inkubiert und getrocknet.

Zur weiteren Verwendung wurde die blockierte Nitrocellulose in Streifen geschnitten (Teststreifen).

Entwicklung der Nitrocellulosestreifen mit Probenmaterial

Als Probenflüssigkeit eignen sich Serum, Plasma, CSF (zerebrospinale Flüssigkeit) oder Synovialflüssigkeit.

Der mit Antigen beschichtete Nitrocellulosestreifen (=Teststreifen, zum Beispiel Darstellung 1) wird in 1,5 ml Waschpuffer bestehend aus Trishydroxymethylaminomethan (3,25 g/l), Natriumchlorid (7,51 g/l), Tween 20 (3,83 ml/l), Thimerosal (0,02 g/l), Milchpulver (5 g/l), pH 7,5, bei Raumtemperatur 5 min auf einem Wippschüttler in einer Wanne inkubiert. Anschließend wird der Puffer dekantiert. 20 µl Probenflüssigkeit werden zusammengebracht. Der Teststreifen wird 30 min auf mit 1,5 ml Waschpuffer auf den Teststreifen gegeben. Der Teststreifen wird 30 min auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach der Inkubation mit Probenflüssigkeit wird der Test-

streifen dreimal mit jeweils 1,5 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit anti-human-IgG oder anti-human-IgM oder anti-human-IgA – alkalische Phosphatase-Konjugat inkubiert. Anschließend wird mit jeweils 1,5 ml Waschpuffer dreimal jeweils 5 min gewaschen. In einem weiteren Waschschnitt wird mit destilliertem Wasser für 1 min nachgewaschen und anschließend mit Chromogen/Substrat Lösung (BCIP/NBT) entwickelt. Die Entwicklung wird entsprechend der Färbung einer Cut-Off Kontrolle durch Dekantieren der Entwicklungslösung und dreimaliges Waschen mit jeweils 1,5 ml destilliertem Wasser gestoppt.

Interpretation der Färbungen auf den Teststreifen

Auf den Teststreifen werden Färbeintensitäten der Antigenlinien mit der Färbeintensität der Cut-Off Kontrolle verglichen. Eine Färbeintensität kann durch Scannen (handelsübliche Farbscanner; Programm Virascan, Viramed, Planegg, Deutschland) der entwickelten Teststreifen quantifiziert werden. Aus den Messwerten der Färbeintensitäten werden Verhältnisse zur Cut-Off Kontrolle berechnet (Ratio). Ist das Ratio größer oder gleich eins, so wird eine entsprechend gefärbte Antigenlinie als positiv gewertet. Ist das Ratio kleiner als eins aber größer oder gleich 0,5 so wird die entsprechende Antigenlinie grenzwertig gewertet. Ist das Ratio kleiner als 0,5 so wird die entsprechende Antigenlinie negativ gewertet.

Eine oder mehrere positive Antigenlinien der Proteine 47 kD, 44,5 kD, 17 kD oder 15 kD weisen auf das Vorhandensein entsprechender Antikörper in der jeweiligen untersuchten Probe hin.

Eine oder mehrere positive Antigenlinien der aufgetragenen VDRL Verdünnungsstufen weisen auf das Vorhandensein von anti Cardiolipin Antikörpern eines entsprechenden Titers hin. Es besteht eine Korrelation zwischen dem VDRL-Titer, ermittelt nach dem herkömmlichen VDRL Testverfahren und der quantifizierbaren Färbeintensität der VDRL Antigenlinien auf dem Teststreifen. Somit ist das Trägergebundene VDRL ein geeignetes Mittel zum quantitativen, zumindest semi-quantitativen, Nachweis von Anti-Cardiolipin-Antikörpern und kann somit zur Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion herangezogen werden.

Ansprüche

1. Träger für die Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion, umfassend
 - a) mindestens ein immobilisiertes Cardiolipin und
 - b) mindestens ein immobilisiertes Treponema-spezifisches-Antigen.
2. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Cardiolipin zusammen mit Lecithin und Cholesterin als VDRL-Antigen vorliegt, wobei diese Produkte vorzugsweise in einem Massenverhältnis Cardiolipin : Lecithin : Cholesterin von 0,1 - 4,0 : 1 – 5,0 : 1-10 vorliegen.
3. Träger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Cardiolipin in mindestens zwei, vorzugsweise in mindestens drei, besonders bevorzugt in mindestens vier verschiedenen Konzentrationen an unterschiedlichen Positionen des Trägers vorliegt.
4. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei, vorzugsweise mindestens drei, besonders bevorzugt mindestens vier verschiedene Treponema-Antigene in unterschiedlichen Positionen auf dem Träger vorliegen.
5. Träger nach einem Ansprache 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene ausgewählt werden aus Treponema pallidum spezifischen Antigen, vorzugsweise dem 15kD, 17 kD, 44,5 kD und 47 kD Antigenen.
6. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger weitere Kontrollen umfaßt.
7. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kontrolle eine Serumkontrolle ist, vorzugsweise Protein A.

8. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kontrolle eine Cu-Off-Kontrolle ist, vorzugsweise enthaltend gereinigtes humanes Immunglobulin.
9. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger ausgewählt wird aus Nitrocellulose, PVDF (Polyvinylidendifluorid), Nylon, Celluloseacetat und Polystyrol.
10. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger als Teststreifen zum Einsatz in der Immundiagnostik ausgestaltet ist.
11. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger als Immunoblot ausgestaltet ist.
12. Verfahren zur Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion, dadurch gekennzeichnet, dass ein Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit einer Patientenprobe in Kontakt gebracht wird und das Vorliegen von Antikörpern gegen ein Treponema-Antigen und/oder ein Cardiolipin bestimmt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktivität von Antikörpern aus dem Patientenserum mit dem Cardiolipin des Teststreifens mehrmals über einen längeren Zeitraum ermittelt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Patientenprobe Blut, Serum, Plasma, Liquor oder Synovialflüssigkeit ist.
15. Testkit zur Diagnose einer Treponemainfektion und/oder der Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion, enthaltend einen Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und weitere Reagenzien sowie eine Gebrauchsanleitung zur Durchführung des Nachweisverfahrens.
16. Verwendung eines Trägers nach einem der Ansprüche 1 bis 11 in der Diagnostik und/oder der Verlaufskontrolle einer Treponemainfektion.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Träger für die Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponema-Infektion sowie ein Diagnostik-Verfahren unter Einsatz des genannten Trägers. Erfindungsgemäß wird ein Träger für die Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle einer Treponema-Infektion bereitgestellt, der mindestens ein immobilisiertes Cardiolipin und mindestens ein immobilisiertes Treponema-spezifisches Antigen umfasst. Ferner wird ein Verfahren zur Diagnostik und/oder Verlaufskontrolle unter Verwendung des Trägers bereitgestellt.

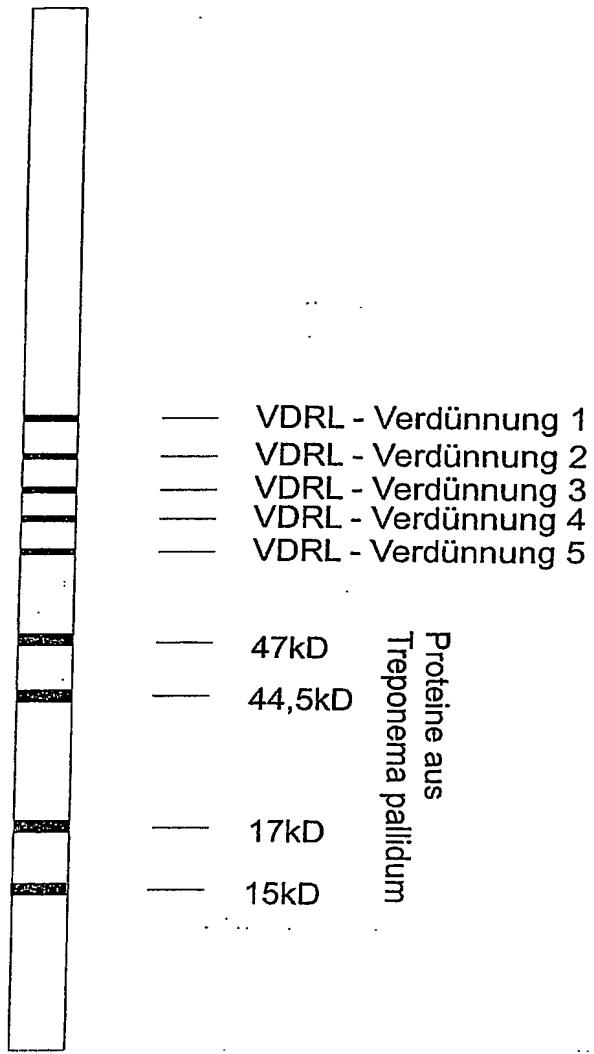


Abbildung 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.